การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกรวมของเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่แยกจากน้ำหมักชีวภาพ

Determination of Antioxidant Activities and Total Phenolic Content of Bioactive Peptide Isolated from Biofermented Liquids

สุธารทิพย์ เรืองประภาวุฒิ[1*] ธเนศ โสภณนิธิประเสริฐ[1] และ ภูมภัสส์ พุทธ์ผดุงวิพล[2]

Sutarnthip Ruengprapavut[1*] Thanet Sophonnithiprasert[1] and Pumpath Putpadungwipon[2]

[1]หมวดวิชาชีวเคมี ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี ประเทศไทย

[2]ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี ประเทศไทย

[1]Biochemistry unit, Department of Medical sciences, Faculty of Science, Rangsit University, Pathum Thani, Thailand

[2]Department of Clinical chemistry, Faculty of Medical technology, Rangsit University, Pathum Thani, Thailand

[*]Corresponding author, E-mail: sutarnthip.r@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

เปปไทด์ออกฤทธิ์หรือ Bioactive peptides (BP) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยสายเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 2-20 ตัว สามารถพบได้ทั่วไปจากแหล่งธรรมชาติและมีบทบาทสำคัญกับสุขภาพในด้านต่างๆ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันโรค ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อแยกเปปไทด์ออกฤทธิ์จากน้ำหมักชีวภาพ 8 ชนิด ได้แก่ น้ำหมักมะขามป้อม น้ำหมักมะเฟือง น้ำหมักมังคุด น้ำหมักทับทิม น้ำหมักฟักข้าว น้ำหมักสตรอเบอร์รี่ น้ำหมักผลไม้รวม และน้ำหมักปลาชีวภาพ นำไปศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrythydrazyl (DPPH) และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu ตอนแรกน้ำหมักส่วนหยาบ (crude) ถูกนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloroacetic acid (TCA)/Acetone น้ำหมักชีวภาพจากมะขามป้อมและฟักข้าวที่มีระดับฟีนอลสูงสุดถูกนำไปแยกต่อโดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลที่ขนาดต่ำกว่า 3 กิโลดัลตัน (KDa)โดยใช้คอลัมน์ NANOSEP 3K เฉพาะเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 KDa ถูกนำไปศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลการศึกษาพบว่าเปปไทด์ส่วนหยาบในน้ำหมักทั้ง 8 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งอยู่ในช่วง 90-95 % แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เปปไทด์ที่แยกจากน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 KDa จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ 63.79±0.759 % และ 28.95±2.742 % ตามลำดับ ปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวเท่ากับ 73.14±1.003 และ 69.19±0.705 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตรเทียบกับกรดแกลลิก ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการนำเอาสารที่มีฤทธิ์ต้านอิสระที่สกัดจากธรรมชาติไปประยุกต์ใช้ในทางอาหารและยาต่อไป

คำสำคัญ: *เปปไทด์ออกฤทธิ์, สารต้านอนุมูลอิสระ, น้ำหมักชีวภาพ, สารประกอบฟีนอลิกรวม*

Abstract

Bioactive peptides (BPs) are organic compounds that include a peptide residue length of between 2-20 amino acids. Bioactive peptides can be found and isolated from various natural sources. BPs play important roles in human health, enhancing immunomodulatory and antimicrobial activity as antioxidants. The aim of this research were to isolate bioactive peptides from 8 biofermented liquids (Gooseberry, Star fruit, Mangosteen, Pomegranate, Baby Jackfruit, Strawberry, Mixed fruit and Biofish), and to study their antioxidant activities by 2,2-diphenyl-1-picrythydrazyl (DPPH) radical scavenging, and to discover the total phenolic contents by Folin-Ciocalteu. First, peptides were isolated from crude biofermented liquids through the precipitation using Trichloroacetic acid (TCA) and Acetone. Two biofermented liquids (Gooseberry and Baby Jackfruit) containing the highest phenolic contents were selected for further isolation. They were then separated and concentrated based on the peptide molecular weights of less than 3 Kilodaltons (KDa) difference by using NANOSEP 3K column. The peptides with molecular weights of less than 3 KDa were further investigated for their antioxidant activities. The results showed that 8 crude biofermented liquids showed high antioxidant activities with the % inhibition in the range of 90-95 had no significant differences. The peptides isolated from Gooseberry and Baby Jackfruit with molecular weights of less than 3 KDa showed high antioxidant activity with the % inhibition of 63.79±0.759 % and 28.95±2.742 %, respectively. The total phenolic contents obtained from these two peptides were 73.14±1.003 and 69.19±0.705 µg/ml Gallic acid Equivalent, respectively. The natural antioxidants obtained from this research would be beneficial for pharmaceutical and food applications.

Keywords: *Active Peptides, Antioxidant, Biofermented liquid, Total phenolic compound*

1. บทนำ

เปปไทด์ออกฤทธิ์หรือ Bioactive peptides เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 2-20 ตัว มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ สามารถพบและสกัดได้จากแหล่งธรรมชาติมากมาย เช่น ในน้ำนม ในพืชหรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ซึ่งเปปไทด์ที่สกัดได้จะมีบทบาทสำคัญและมีประโยชน์มากมายต่อสุขภาพในด้านต่าง ๆ เช่น มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย ลดความดันโลหิต หรือต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Moller et al., 2008) ในปัจจุบันเปปไทด์ออกฤทธิ์ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะส่งผลดีต่อสุขภาพและสามารถป้องกันโรคต่างๆ ได้ มีการค้นพบเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลมากกว่า 15,000 ชนิด ซึ่งโครงสร้างและลำดับกรดอะมิโนที่พบในเปปไทด์แต่ละชนิดจะมีบทบาทสำคัญในการทำงานของเปปไทด์ (Singh, Vij, and Hati, 2014) เปปไทด์ออกฤทธิ์หลายชนิดสามารถสกัดจากแหล่งอาหารประเภทต่างๆ เช่น น้ำนม ผลิตภัณฑ์จากนมโยเกิร์ต (Kitts & Weiler, 2003) ไข่ (Liu et al., 2010) ปลา (Elias, Kellerby, and Decker, 2008) และถั่วเหลืองหมัก (Wang and De Mejia, 2005; Singh, Vij, and Hati, 2014) พบว่าเปปไทด์เหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งภาวะที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระสะสมมากจะ

ส่งผลเสียต่อสุขภาพตามมาและสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น มะเร็ง สมองเสื่อม ข้ออักเสบ เป็นต้น (Ramana, Srivastava and Singhal, 2013)

น้ำหมักชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักวัสดุตามธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์ เศษอาหาร ส่วนใหญ่เป็นการผลิตในระดับครัวเรือนและชุมชน และมีการนำผลผลิตที่ได้มาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น กำจัดกลิ่น ป้องกันโรค ควบคุมคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำ รักษาโรคแผลต่างๆในปลา กบ จระเข้ นอกจากนี้น้ำหมักชีวภาพจากพืชสมุนไพรที่ควบคุมการผลิตให้สะอาดปลอดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนสามารถนำมาบริโภคเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันและสร้างเสริมสุขภาพ ประโยชน์ของน้ำหมักชีวภาพดังกล่าวมาจากสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสารเหล่านั้นมีคุณสมบัติในด้านต่างๆ เช่น ต้านทานเชื้อจุลชีพ เพิ่มภูมิคุ้มกัน และต้านอนุมูลอิสระ (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2553)

จากคุณประโยชน์ของน้ำหมักที่กล่าวมา จึงเป็นที่มาของงานวิจัยครั้งนี้ที่มีเป้าหมายเพื่อคัดกรองหาเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่สกัดจากน้ำหมักชีวภาพจากครัวเรือนชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ องค์ความรู้ที่ได้เป็นการนำเอาจผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ผลิตในชุมชนไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อประเทศชาติต่อไปโดยเฉพาะทางด้านอาหารและยา

2. วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ในน้ำหมักชีวภาพจากชุมชนจำนวน 8 ชนิด ทั้งในน้ำหมักแบบหยาบและที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloroacetic acid (TCA) /Acetone และแยกความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ที่มีขนาดต่ำกว่า 3 กิโลดัลตันโดยใช้คอลัมน์ NANOSEP 3K

3. อุปกรณ์และวิธีการ / วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพ

เก็บน้ำหมักชีวภาพจากท้องตลาดจำนวนทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ น้ำหมักมะขามป้อม น้ำหมักมะเฟือง น้ำหมักมังคุด น้ำหมักทับทิม น้ำหมักฟักข้าว น้ำหมักสตรอเบอร์รี่ น้ำหมักผลไม้รวม น้ำหมักปลาชีวภาพ นำน้ำหมักทั้ง 8 ชนิดมาฆ่าเชื้อจุลชีพด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman™ Qualitative Filter Paper No.2 (GE Healthcare, USA) จนได้น้ำหมักที่มีลักษณะใสและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{o}C จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วย Trichloroacetic acid (TCA) /Acetone

ตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมักโดยวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Hao et al. (2015) ผสมสาร 3 ชนิด ได้แก่ น้ำหมักชีวภาพ: 100 % ice-cold acetone : 100 % Trichloroacetic acid (TCA) ตามลำดับเข้าด้วยกันในหลอดทดลองด้วยอัตราส่วน 1:8:1 นำหลอดทดลองไปเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,500 rpm เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยการ

เติม Acetone ปริมาตร 3 มิลลิลิตร แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,500 rpm เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ทำการล้างตะกอนซ้ำจำนวน 4 ครั้ง ด้วย Acetone เพื่อล้าง TCA ออกให้หมด ละลายตะกอนด้วย phosphate buffer pH 7.0 แล้วนำไปแยกขนาดเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 กิโลดัลตันด้วยชุดหลอดคอลัมน์ปั่นเหวี่ยงมีเมมเบรนชนิด Nanosep® Centrifugal Devices with Omega™ Membrane – 3K (PALL corporation, USA) ในลำดับขั้นตอนถัดไป

3.3 การแยกเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 KDa

กระบวนการแยกเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 3 KDa ทำตามวิธีในคู่มือจาก Nanosep® Centrifugal Devices with Omega™ Membrane - 3K (PALL corporation, USA) โดยทำการล้าง Omega™ Membrane ด้วย sterilize water จำนวน 2 รอบ ใส่น้ำหมักปริมาตร 500 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที น้ำหมักที่ได้จะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนบนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 3 กิโลดัลตัน และส่วนล่างที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดัลตัน นำน้ำหมักส่วนล่างที่มีขนาดน้อยกว่า 3 KDa ไปศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และหาปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ในลำดับขั้นถัดไป

3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วย วิธี 2,2-diphenyl-1-picrythydrazyl (DPPH)

ทดสอบหาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำหมักชีวภาพตามวิธีของ Que, Mao, and Pan (2006) เตรียมสารละลาย DPPH ใน ethanol (EtOH) ให้มีความเข้มข้น 1x10^{-4} M นำไปทำปฏิกิริยากับน้ำหมักชีวภาพ ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปหาค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Butylhydroxytoluene (BHT) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 5-100 µg/mL ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหาได้จากสมการต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibition ของ Sample} = \frac{[(OD^{control}-(OD^{test}-OD^{blank}(test)]}{OD^{control}} \times 100$$

$$\% \text{ inhibition ของ DPPH} = \frac{OD^{control} - OD^{test}}{OD^{control}} \times 100$$

** control หมายถึง BHT ที่ 0 µg/ml

**blank control หมายถึง EtOH แทน DPPH

คำนวณค่าของ % inhibition แต่ละความเข้มข้นแล้วนำไปทำ linear regression เพื่อหาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งการเกิด oxidation

3.5 การหาปริมาณฟีนอลรวม

หาปริมาณฟีนอลรวมในสารตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพโดยอ้างอิงตามวิธีของ Li et al. (2007) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 0-80 µg/mL ใส่ในหลุม Microtiter plate เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu's phenol (10% ในน้ำ) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย 7 % NA_2CO_2 ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตรด้วยเครื่อง EZ Read 2000 microplate reader (Biochrom Ltd., UK) ค่าที่ได้จะนำไปเทียบกับสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก (Gallic acid equivalence)

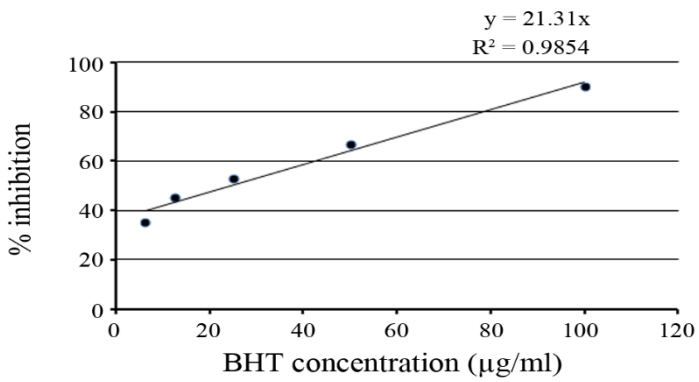
3.6 สถิติในการวิจัย

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างน้ำหมักทั้ง 8 ชนิดด้วยการใช้สถิติ One-way Anova กำหนดค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ *p*-value น้อยกว่า 0.05

4. ผลการวิจัย

กราฟมาตรฐานของ Butylhydroxytoluene (BHT)

ในการศึกษาครั้งนี้หาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพ 8 ชนิดโดยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrythydrazyl (DPPH) และใช้ Butylhydroxytoluene (BHT) เป็นสารมาตรฐานในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0-100 ug/ml) โดยวัดความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 520 nm และหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition) เมื่อพล็อตกราฟเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า % Inhibition หรือเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการสารต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารมาตรฐาน BHT จะได้กราฟเป็นเส้นตรง มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9854 ดังแสดงในรูปที่ 1

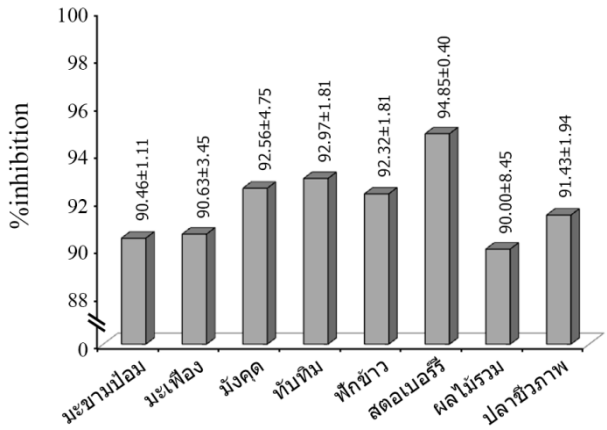


รูปที่ 1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BHT และ % inhibition

4.2 ความสามารถในฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของน้ำหมักแบบหยาบ

เมื่อนำน้ำหมักแบบหยาบทั้ง 8 ชนิด มาศึกษาหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH โดยวัดความสามารถในการดูดแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 520 nm และวัดค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition) ได้ผลดัง

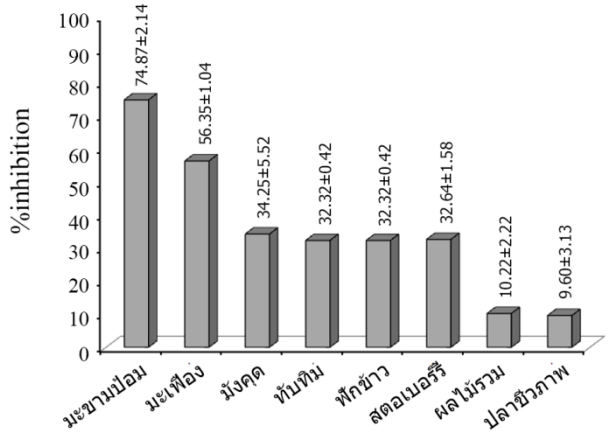
แสดงในรูปที่ 2 พบว่าน้ำหมักทั้ง 8 ชนิดซึ่งประกอบไปด้วย 1. น้ำหมักมะขามป้อม 2. น้ำหมักมะเฟือง 3. น้ำหมักมังคุด 4. น้ำหมักทับทิม 5. น้ำหมักฟักข้าว 6. น้ำหมักสตอเบอร์รี่ 7. น้ำหมักผลไม้รวม 8. น้ำหมักปลาชีวภาพ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยพบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 90.46±1.117 % , 90.63±3.473 % , 92.56±4.746 % , 92.32±1.814 % , 92.97±1.810 % , 94.85±0.399 %, 90.00±8.454 % และ 91.43±1.944 % ตามลำดับ น้ำหมักสตอเบอรี่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุดถึง 94.85±0.399 %



รูปที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพแบบหยาบทั้ง 8 ชนิด

4.3 ความสามารถในฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH ของน้ำหมักที่ผ่านการตะกอนด้วย TCA/Acetone

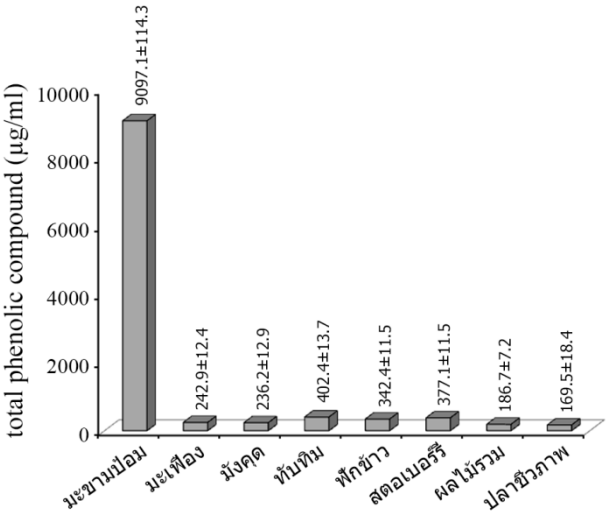
เมื่อนำน้ำหมักมาผ่านการตกตะกอนด้วย TCA/Acetone และละลายตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักทั้ง 8 ชนิดจะแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ โดยน้ำหมักชีวภาพจากมะขามป้อมที่ผ่านการตกตะกอนจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 74.87±2.138 % รองลงมาได้แก่น้ำหมักมะเฟืองโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 56.35±1.041 % ส่วนอันดับสามได้แก่น้ำหมักมังคุดมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 34.25±5.518 % ส่วนน้ำหมักที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดได้แก่น้ำหมักปลาชีวภาพโดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.60±3.13 % ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำหมักชีวภาพทั้ง 8 ชนิดที่ผ่านการตกตะกอนด้วย TCA/acetone

4.4 ปริมาณฟีนอลรวม (TP) โดยวิธี Folin-Ciocalteu ในน้ำหมักแบบหยาบ

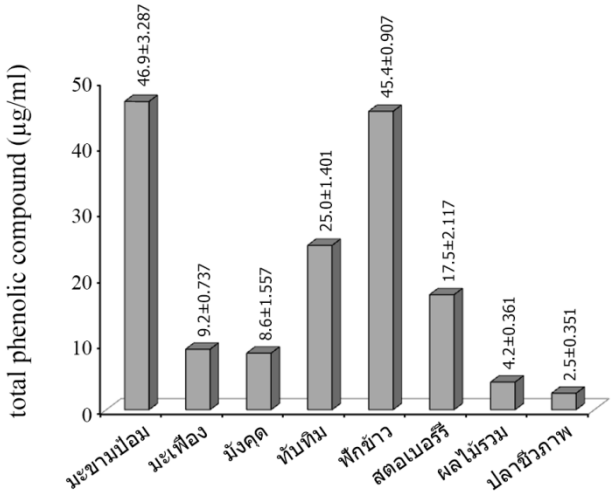
การทดสอบหาปริมาณฟีนอลรวมจากน้ำหมักชนิดหยาบทั้ง 8 ชนิดโดยวิธี Folin-Ciocalteu เทียบกับกรดแกลลิก พบว่าปริมาณฟีนอลรวมในน้ำหมักเรียงจากมากไปน้อยดังนี้ น้ำหมักมะขามป้อมมีค่าสูงสุดเท่ากับ 9097.1±114.25 ug/ml ต่อกรดแกลลิก, ทับทิม 402.4±13.704 ug/ml ต่อกรดแกลลิก, สตอเบอร์รี่ 377.1±11.45 ug/ml ต่อกรดแกลลิก, ฟักข้าว 342.4±11.481ug/ml ต่อกรดแกลลิก, มะเฟือง 242.9±12.434 ug/ml ต่อกรดแกลลิก, มังคุด 236.2±12.874 ug/ml ต่อกรดแกลลิก, ปลาชีวภาพ 169.5±18.359 ug/ml ต่อกรดแกลลิก, ผลไม้รวม 186.7±7.199 ug/ml ต่อกรดแกลลิก ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ปริมาณความเข้มข้นของฟีนอลรวมในน้ำหมักแบบหยาบ

4.5 ปริมาณฟีนอลรวม (TP) โดยวิธี Folin-Ciocalteu ในน้ำหมักที่ผ่านการตะกอนด้วย TCA/Acetone

การทดสอบหาปริมาณฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu จากน้ำหมักที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนทั้ง 8 ชนิด พบว่าปริมาณฟีนอลรวมในน้ำหมักแต่ละชนิดเรียงตามลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ มะขามป้อมมีค่าฟีนอลรวมสูงสุดเท่ากับ 46.9±3.287 µg/ml ต่อกรดแกลลิก ตามด้วยฟักข้าว 45.4±0.907 µg/ml ต่อกรดแกลลิก, ทับทิม 25.0±1.401 µg/ml ต่อกรดแกลลิก, สตอเบอร์รี่ 17.5±2.117 µg/ml ต่อกรดแกลลิก, มะเฟือง 9.2±0.737 µg/ml ต่อกรดแกลลิก, มังคุด 8.6±1.557 µg/ml ต่อกรดแกลลิก, ผลไม้รวม 4.2±0.361 µg/ml ต่อกรดแกลลิก, ปลาชีวภาพ 2.5±0.351 µg/ml ต่อกรดแกลลิก ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 ปริมาณความเข้มข้นของฟีนอลรวมน้ำหมักชีวภาพทั้ง 8 ชนิดที่ผ่านการตกตะกอนด้วย TCA/acetone

4.6 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลรวมของน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวที่ผ่านการแยกขนาดโมเลกุลด้วยวิธี NANOSEP 3K

เนื่องจากพบว่าปริมาณฟีนอลรวมในน้ำหมักที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนในน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวมีค่าสูงเมื่อเทียบกับน้ำหมักทั้ง 8 ชนิด จึงนำน้ำหมักทั้งสองชนิดมาศึกษาต่อโดยแบ่งออกตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี NANOSEP 3K สามารถแยกน้ำหมักออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 3 กิโลดัลตัน (>3K) และส่วนที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดัลตัน (<3K) เฉพาะส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดัลตัน (<3K) จะถูกนำมาทดสอบหาฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และหาปริมาณฟีนอลรวมต่อไปพบว่าน้ำหมักมะขามป้อมในส่วน <3K มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดโดยมีความสามารถในการยับยั้งถึง 63.79±0.759 % ส่วนน้ำหมักฟักข้าวในส่วน <3K มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 28.95±2.742 % ปริมาณฟีนอลรวมในน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวในส่วน <3K มีปริมาณฟีนอลรวมเท่ากับ 73.14±1.003 µg/ml ต่อกรดแกลลิก และ 69.19±0.705 µg/ml ต่อกรดแกลลิก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือ **%** Inhibition และปริมาณฟีนอลรวม (TP) ในน้ำหมักน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดัลตัน (<3K)

มะขามป้อม		**ฟักข้าว**	
% Inhibition	**TP** (μg/ml)	**% Inhibition**	**TP** (μg/ml)
63.79±0.759	73.14±1.003	28.95±2.742	69.19±0.705

5. การอภิปรายผล

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการคัดกรองหาเปปไทด์ออกฤทธิ์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากน้ำหมักชีวภาพจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ มะขามป้อม มะเฟือง มังคุด ทับทิม ฟักข้าว สตอเบอร์รี่ ผลไม้รวม และปลาชีวภาพ โดยศึกษาทั้งแบบชนิดหยาบและที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วย TCA และ Acetone เพื่อแยกเอาเปปไทด์ออกมาและนำไปศึกษาหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl method) โดยเทียบกับสารมาตรฐาน BHT และหาปริมาณฟีนอลรวมโดยวิธี Folin-Ciocalteu และเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ผลจากการวิจัยครั้งนี้พบว่าน้ำหมักแบบหยาบทั้ง 8 ชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วง 90-95 % และไม่พบความแตกต่างทางสถิติในน้ำหมักทั้ง 8 ชนิดที่ $p>0.05$ แต่เมื่อนำน้ำหมักมาผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย TCA และ Acetone พบว่าน้ำหมักมะขามป้อมมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเท่ากับ 74.87±2.138 % ส่วนน้ำหมักที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่ำที่สุดได้แก่น้ำหมักปลาชีวภาพโดยมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเท่ากับ 9.60±3.13 %

เปปไทด์ในน้ำหมักมะขามป้อมออกฤทธิ์ได้ดีทั้งในแบบน้ำหมักแบบหยาบและที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนโดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 90.46±1.117 % และ 74.87±2.138 % ในชนิดหยาบและที่ผ่านการตกตะกอน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pientaweeratch, Panapisal, and Tansirikongkol (2016) พบว่าสารสกัดจากมะขามป้อมมีศักยภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมในน้ำหมักมะขามป้อมแบบหยาบมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุดคือเท่ากับ 9097.1±114.25 μg/ml ต่อกรดแกลลิก ส่วนน้ำหมักปลาชีวภาพมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมต่ำที่สุดเท่ากับ 169.5±18.359 μg/ml ต่อกรดแกลลิก เมื่อนำน้ำหมักมะขามป้อมมาผ่านการตกตะกอนโปรตีนจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงสุด เท่ากับ 46.9±3.287 μg/ml ต่อกรดแกลลิก ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมต่ำที่สุดได้แก่น้ำหมักปลาชีวภาพ เท่ากับ 2.5±0.351μg/ml ต่อกรดแกลลิก

เปปไทด์จากน้ำหมักมะขามป้อมทั้งแบบหยาบและที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมสูงที่สุด ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำหมักมะขามป้อม ดังนั้นฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน่าจะมาจากสารในกลุ่มฟีนอล ส่วนน้ำหมักอีก 7 ชนิดที่เหลือในแบบหยาบมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกันแต่ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวมมีน้อยกว่าน้ำหมักมะขามป้อม ดังนั้นฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำหมักเหล่านั้นอาจมาจากสารอื่นนอกเหนือจากสารในกลุ่มฟีนอลซึ่งรวมถึงเปปไทด์ที่ได้จากการสกัดในครั้งนี้ด้วย

เมื่อนำน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนมาศึกษาต่อโดยแยกเอาเปปไทด์ออกมาตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี NANOSEP 3K สามารถแยกเปปไทด์จากน้ำหมักออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 3 กิโลดัลตัน (>3K) และส่วนที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดัลตัน (<3K) พบว่าเปปไทด์จากน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวในส่วน <3K ยังคงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยมีความสามารถในการยับยั้งเท่ากับ 63.79±0.759 % และ 28.95±2.742 % ตามลำดับ และมีปริมาณฟีนอลรวมในน้ำหมักทั้งสองชนิดเท่ากับ 73.14±1.003 และ 69.19±0.705 µg/ml ต่อกรดแกลลิก ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำหมักฟักข้าวมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tinrat, Akkarachaneeyakorn, and Singhapol (2014) เปปไทด์ที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพชีวภาพทั้งสองแหล่งจะถูกนำไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น โครมาโตมาโตกราฟรี เพื่อทำการแยกและศึกษาคุณสมบัติสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในน้ำหมักทั้งสองชนิดต่อไป

6. บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำหมักชีวภาพชนิดหยาบจากน้ำหมัก 8 ชนิด ได้แก่น้ำหมักมะขามป้อม น้ำหมักมะเฟือง น้ำหมักมังคุด น้ำหมักทับทิม น้ำหมักฟักข้าว น้ำหมักสตรอเบอร์รี่ น้ำหมักผลไม้รวม และน้ำหมักปลาชีวภาพ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี DPPH (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl method) โดยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอยู่ในช่วง 90-95 % และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำน้ำหมักชนิดหยาบมาผ่านการตกตะกอนโปรตีนด้วย TCA และ Acetone พบว่าน้ำหมักจากมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดอยู่ที่ 74.87±2.138 % และเมื่อนำน้ำหมักจากมะขามป้อมและฟักข้าวจากส่วนที่ได้จากการตกตะกอนมาแยกต่อตามความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า 3 กิโลดัลตันโดยใช้โดยใช้คอลัมน์ NANOSEP 3K พบว่าเปปไทด์จากน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3 กิโลดัลตันยังคงมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงโดยมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอยู่ที่ 63.79±0.759 % และ 28.95±2.742 % ตามลำดับ และปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าวเท่ากับ 73.14±1.003 และ 69.19±0.705 ไมโครแกรมต่อมิลลิลิตรเทียบกับกรดแกลลิก ตามลำดับ ซึ่งฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระจะสอดคล้องกับปริมาณสารฟีนอลรวมในน้ำหมักมะขามป้อมและฟักข้าว

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการคัดกรองหาเปปไทด์ออกฤทธิ์จากตัวอย่างน้ำหมักจากพืชผักและผลไม้ที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เพื่อเป็นแนวทางในการนำเอาน้ำหมักชีวภาพมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปโดยเฉพาะทางด้านอาหารและยา

7. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือจากหลายฝ่ายโดยเฉพาะเจ้าหน้าที่และคณาจารย์ประจำหมวดวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ในการให้ความอนุเคราะห์ในด้านต่างๆ เช่น การใช้สถานที่และเครื่องมือต่างๆ เป็นต้น และท้ายสุดขอขอบคุณสถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนงานวิจัย ทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินการได้ ซึ่งผู้วิจัยหวังว่าความรู้ที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดและเอาไปประยุกต์ใช้เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสังคมและประเทศชาติต่อ

8. เอกสารอ้างอิง

ไชยวัฒน์ ไชยสุต (2553) น้ำหมักชีวภาพ หนังสือชุด สุขภาพดีและความงามเริ่มจากข้างใน. ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อสังคม สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ: 8-30.

Elias, R. J., Kellerby, S. S., and Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 430–441.

Hao, R., Adoligbe, C., Jiang, B., Zhao, X., Gui, L., Qu, K., Wu, S., and Zan, L. (2015). An Optimized Trichloroacetic Acid/Acetone Precipitation Method for Two-Dimensional Gel Electrophoresis Analysis of Qinchuan Cattle Longissimus Dorsi Muscle Containing High Proportion of Marbling. *PLoS ONE*, 10(4): e0124723 doi:10.1371.

Kitts, D. D., and Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309–1323.

Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C.C., Fan, K. W., Chen, F., and Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102:771-776.

Liu, J. B., Wang, Y., Guo, Y., Xu, H. L., Lin, S. Y., and Yin, Y. G. (2010). Optimization of bioactive peptides derived from egg white protein. *Journal of Jilin University* (Engineering and Technology Edition), 40: 389–394.

Moller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., and Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47: 171–182.

Pientaweeratch, S., Panapisal, V., and Tansirikongkol, A. (2016). Antioxidant, Anticollagenase and Anti-Elastase Activities of Phyllanthus Emblica, Manilkara Zapota and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharmaceutical Biology*, 54 (9): 1865-1872.

Que, F., Mao, L., and Pan, X. (2006). Antioxidant activities of five Chinese rice wines and the involvement of phenolic compounds. *Food Research International*, 39:581-587.

Ramana, K. V., Srivastava, S., and Singhal, S. S. (2013). Lipid Peroxidation Products in Human Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013:583438. Doi:10.1155/2013/583438.

Singh, B. P., Vij, S., and Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides*, 54: 171–179.

Tinrat, S., Akkarachaneeyakorn, S., and Singhapol, C. (2014). Evaluation OF Antioxidant and Antimicrobial Activities of Momordica Cochinchinensis Spreng (Gac Fruit) Ethanol Extract. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 5(8): 3163-3169.

Wang, W., and De Mejia, E. G. (2005). A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4(4): 63-78.